

凝胶色谱多种检测器的平台

目前，GPC 已经发展成多检测器的平台。在示差检测器的基础上，还有光散射检测器（含静态光散射和动态光散射）、黏度检测器、紫外检测器、红外检测器及 ELSD 检测器。

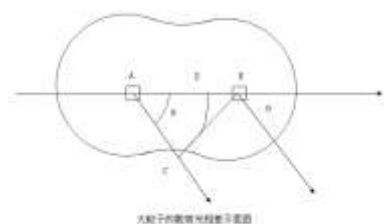
一般在表征大分子的分子量及其分布的方面。除了必须用示差检测器外，用的最为广泛的的就是光散射检测器。

一. 静态光散射

对于分子量较高的聚合物形成的大粒子溶液，必须考虑其内干涉效应，如图 所示。由散射中心 A 和 B 所发射的光波沿同一角度 θ 到达某一观测点时有一个光程差 Δ ，该值与散射角余弦有关，即

$$\Delta = DB = AB - AD = AB(1 - \cos\theta) \quad (1)$$

由式 (1) 可知，当 $\theta = 0^\circ$ 时， $\Delta = 0$ ， θ 增大， Δ 值增大，散射光强减弱。当 $\theta = 180^\circ$ 时，



Δ 出现极大值，散射光强出现极小值。若将 $90^\circ > \theta > 0^\circ$ 称

为前向， $180^\circ > \theta > 90^\circ$ 称为后向，由于大粒子散射光的内干涉效应，前后向散射光强不对称，前向散射光强大于后向，如左所示。

表征散射光的不对称性参数称为散射因子 $P(\theta)$ ，它是粒子尺寸和散射角的函数，由式 (2) 表示

$$P(\theta) = 1 - \frac{16\pi^2}{3(\lambda')^2} \overline{s^2} \sin^2 \frac{\theta}{2} + \dots \quad (2)$$

$$\lambda' = \lambda/n$$

式中 $\overline{s^2}$ —— 均方旋转半径；

λ' —— 入射光在溶液中的波长。

显然， $P(\theta) \leq 1$ 。由此，式 $R_\theta = \frac{Kc}{\frac{1}{M} + 2A_2c} \left(\frac{1 + \cos^2 \theta}{2} \right)$ 小粒子散射公式可以修正如下

$$\frac{1 + \cos^2 \theta}{2} \frac{K_c}{R_\theta} = \frac{1}{M} \frac{1}{P(\theta)} + 2A_2c \quad (3)$$

将 $P(\theta)$ 表达式代入，并利用 $1/(1-x) = 1 + x + x^2 + \dots$ 关系，略去高次项，可得光散射公式：

$$\frac{1 + \cos^2 \theta}{2} \frac{K_c}{R_\theta} = \frac{1}{M} \left(1 + \frac{16\pi^2}{3} \frac{\overline{s^2}}{(\lambda')^2} \sin^2 \frac{\theta}{2} + \dots \right) + 2A_2c \quad (4)$$

对于无规线团分子

$$\overline{s^2} = \frac{\overline{h^2}}{6}$$

$\overline{h^2}$ 为均方末端距，可得无规线团光散射公式如下

$$\frac{1 + \cos^2 \theta}{2} \frac{K_c}{R_\theta} = \frac{1}{M} \left(1 + \frac{8\pi^2}{9} \frac{\overline{h^2}}{(\lambda')^2} \sin^2 \frac{\theta}{2} + \dots \right) + 2A_2c \quad (5)$$

在散射光的测定中，由于散射角的改变将引起散射体积的改变，而散射体积与 $\sin \theta$ 成反比，因此，实验测得的 R_θ 值应乘以 $\sin \theta$ 进行修正，即

$$\frac{1 + \cos^2 \theta}{2 \sin \theta} \frac{K_c}{R_\theta} = \frac{1}{M} \left(1 + \frac{8\pi^2}{9} \frac{\overline{h^2}}{(\lambda')^2} \sin^2 \frac{\theta}{2} + \dots \right) + 2A_2c \quad (6)$$

试验测定一系列不同浓度溶液在不同散射角时的瑞利系数 R_θ ，以 $\frac{1 + \cos^2 \theta}{2 \sin \theta} \frac{K_c}{R_\theta}$ 对

$\sin^2 \frac{\theta}{2} + qc$ 作图。这里， q 为任意常数，目的是使图形张开为清晰的格子。然后进行 $c \rightarrow 0, \theta \rightarrow 0$ 外推，具体步骤如下：将 θ 相同的点连成线，向 $c=0$ 外推，以求

$\left(\frac{1 + \cos^2 \theta}{2 \sin \theta} \frac{K_c}{R_\theta} \right)_{c \rightarrow 0}$ 。此时，点的横坐标是 $\sin^2 \frac{\theta}{2}$ 的值，并不是零。故需再将

$\left(\frac{1 + \cos^2 \theta}{2 \sin \theta} \frac{K_c}{R_\theta} \right)_{c \rightarrow 0}$ 的点连成线，对 $\sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \rightarrow 0$ 外推；将 c 相同的点外推，对 $\sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \rightarrow 0$

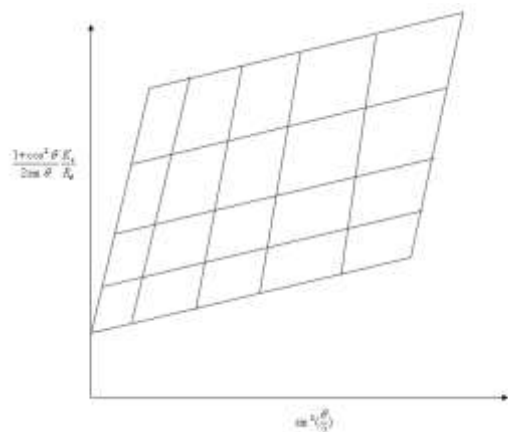
外推，求 $\left(\frac{1 + \cos^2 \theta}{2 \sin \theta} \frac{K_c}{R_\theta} \right)_{\theta \rightarrow 0}$ 。此时，点的横坐标并不为零，而是 qc 值。故需再以

$\left(\frac{1 + \cos^2 \theta}{2 \sin \theta} \frac{K_c}{R_\theta} \right)_{\theta \rightarrow 0}$ 对 c 作图，外推到 $c \rightarrow 0$ 。以上两条外推线在 y 轴应具有同一截距，其

值为 $\frac{1}{M}$ ，可求得聚合物的分子量。而后一条外

推线的斜率为 $2qA_2$ ，前一条外推线的斜率为

$\frac{8\pi^2 \overline{h^2}}{9M(\lambda')^2}$ ，分别可计算出第二维利系数 A_2 和



均方末端距 $\overline{h^2}$ 。

以上为光散射数据处理的 Zimm 作图法，见右示意图所示。

计算中所用单位除了国际单位之外，以往采用下列习用单位：

K 单位为 $\frac{\text{mol} \cdot \text{cm}^2}{\text{g}^2}$ ； A_2 单位为 $\frac{\text{mol} \cdot \text{cm}^3}{\text{g}^2}$ ； c 单位为 g/cm^3 ； $R(\theta)$ 单位为 cm^{-1} ； θ 单

位为度； \overline{M}_w 单位为 g/mol 。

光散射仪主要包括以下四个部分：光源；入射光的准直系统；散射池；散射光强的测量系统，如图 4-14 所示。

经典的光散射仪才用汞灯光源。由于入射光的汇聚性较差，光强较弱，因此，所需散射体积以至于散射池的体积都比较大，溶液用量较多。同时，又由于其准直性和单色性都比较差，

使观测角受到限制，一般只能测量 $30^\circ \sim 150^\circ$ 的散射光，影响了向 $\theta \rightarrow 0$ 外推处理的准确

性。70 年代以来，发展了激光（氦氖光源激光器）作为光源的散射仪。该种仪器光源强，光束可以汇聚得很细，只需用较小的散射体积，减少了溶液用量；同时，单色性和准直性好，

测量可以在很小的角度（ $2^\circ \sim 7^\circ$ ）下进行，提高了实验精度。由于在小角度下散射光的角

度依赖性很小，故数据处理时无需对角度外推。该法测定 \overline{M}_w 的数据偏差减小到 5% 以内，

测量范围扩大至 $5 \times 10^3 \sim 10^7$ 。

二. 光散射仪器

光散射检测器：（德国 ConSensus GmbH 公司）



ConSensus 光散射特色

- ◇ 全球绝无仅有的实现多角度静态动态同时在线联机测定，其他公司仪器或者动态不能联机测试，或者不能同时进行多角度动态测试
- ◇ 最多可实现二十四角度同时测定动态/静态数据，全球唯一
- ◇ 可以根据自己的需要选配检测角的数量，由单角到 24 角度均可选择，能够满足不同用户的多重需要
- ◇ 标准组件配置概念，使得该系统能随心所欲的更换角度位置或者增加角度数量，比如由现有的六角度升级到十二角度
- ◇ 独具特色的 FSLs 技术，得到更小的光散射体积，不用清洗检测池。

仪器性能参数：

光源：532nm，50mW

激光寿命：≥5000 小时

检测器：多角，根据用户要求选配，最多可以达 24 个角度

流通池体积：3μl

三. 静态光散射检测器的应用方向

选择 Debye, Zimm, Berry 或 Guinier 等合适的的数据模型, 进行浓度或者角度外推, 进行光散射的计算, 用户可以获得自己所关心的信息。通过单机使用或者与凝胶液相色谱、场流等设备相结合, 不但可以测得大分子的绝对分子量, 分子旋转半径与第二维里系数, 还可测得分子量分布以及分子的形状, 支化度及聚集态、动力学参数、反应速率等, 在溶液表征领域正扮演着愈来愈重要的角色。

四. 动态光散射

动态光散射技术 (dynamic light scattering, DLS) 是指通过测量样品散射光强度起伏的变化来得出样品颗粒大小信息的一种技术。之所以称为“动态”是因为样品中的分子不停地做布朗运动, 正是这种运动使散射光产生多普勒频移。光在传播时若碰到颗粒, 一部分光会被吸收, 一部分会被散射掉。如果分子静止不动, 散射光发生弹性散射时, 能量频率均不变。但由于分子做杂乱无章的布朗运动, 所以, 当产生散射光的分子朝向监测器运动时, 相当于把散射的光子往监测器送了一段距离, 使光子较分子静止时产生的散射光要早到达监测器, 也就是在监测器看来散射光的频率增高了; 如果产生散射的分子逆向监测器运动, 相当于把散射光子往远离监测器的方向拉了一把, 结果使散射光的频率降低。光散射技术就是根据这种微小的频率变化来测量溶液中分子的扩散速度。动态光散射技术的工作原理可以简述为以下几个步骤: 首先根据散射光的变化, 即多普勒频移测得溶液中分子的扩散系数 D , 再由 Stokes - Einstein 方程可求出分子的流体动力学半径。

$$D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R_h}$$

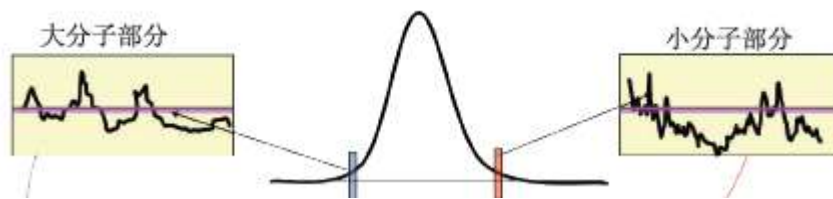
式中: D_0 是扩散系数

K 是波尔兹曼常数

T 是绝对温度 (K)

η_0 是溶液的粘滞系数

R_h 是流体动力学半径



以蛋白为例：

① 可以得知蛋白质分子的均一性

蛋白质样品的均一性是生长晶体的前提条件，在无法直接观察蛋白质在溶液中状态的情况下，生长晶体是一个需要经验和运气的过程。但是用光散射技术，只需要几分钟就可以确切地告诉你，这个样品是否有长出晶体的可能性。你还可以测定蛋白在不同溶液中的状态，从而确定出哪种溶液最适合生长晶体。

③ 测定蛋白质分子的 pH 稳定性

有些蛋白质分子在不同的 pH 值条件下，会有不同的构型，或者形成聚合态，或是变性。如胰岛素在 pH 2.0 时是以单体存在，而在 pH 3.0 时则以二聚体形式存在，当 pH 升至 7.0 时则以六聚体存在。因为这种变化表现为大小的变化，所以光散射技术可以用来测定蛋白质分子的 pH 稳定性。

④ 测定蛋白质分子的热稳定性

对一些热不稳定的蛋白，温度改变会导致分子变性聚合，因此可以观察到分子半径明显增大。所以可以利用光散射技术来研究蛋白质分子的热稳定性。

⑤ 蛋白质变复性及折叠的研究

蛋白质变性时往往是以聚合形式或较松散的状态存在，复性后，蛋白质折叠成天然状态，会发生结构的变化，这一变化可以导致流体动力学半径的变化。所以光散射技术可以用来检测这一动态变化的过程。

⑥ 临界胶束浓度的测定

一定浓度的表面活性剂分子加到溶液中会形成微胶束，但浓度不同会影响胶束的大小以及是否能够形成胶束，如果浓度增加到一定程度，胶束就会形成，胶束大小和单分子大小会有明显区别，利用光散射就可以确定胶束形成的临界浓度。

⑦ 动态光散射技术还可用于一些动态过程的检测，特如蛋白质复性的整个过程的监测。

五. 黏度检测器

黏度检测器是由 4 根毛细管构成。黏度检测器能够测定样品的特性黏度，并能确定分子的尺寸和结构。

六. 紫外检测器

紫外检测器和示差检测器联用，测得共聚物的组成和组成分布。

七. 红外检测器

红外检测器和示差检测器联用，可以测得大分子的结构分布。由于红外检测器和 GPC 使用的难度较大，在这方面应用的例子较少。

四 GPC 的发展方向

（见《新一代微量凝胶色谱 mGPC 的发展》）

五 GPC 常见问题

（见《凝胶渗透色谱异常问题系列讲座 1 异常峰形》）

（见《凝胶渗透色谱异常问题系列讲座 2 峰漂移》）

（见《凝胶渗透色谱异常问题系列讲座 3 基线波动》）

（见《一个解决溶剂峰分离的新手段》）

六 GPC 的发展方向

（见《新一代微量凝胶色谱 mGPC 的发展》）

七新型的大分子分离测试技术

（见《非对称流场流技术在聚合物分析中的应用》）